

文章编号:1003-8701(2008)06-0032-03

耐盐基因 *HAL1* 的克隆及在原核细胞中的表达

于志晶¹, 韦正乙¹, 卢东长城², 蔡勤安¹, 侯敬尧¹, 邢少辰¹

(1. 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130033; 2. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100000)

摘要:以酵母基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 方法得到耐盐基因 *HAL1*, 插入原核表达载体 pGEX-4T-1 的 XhoI 和 EcoRI 酶切位点之间, 构建原核表达载体 pGEX-*HAL1*, 将该载体转化到大肠杆菌中, 重组菌株用 IPTG 诱导表达, 其耐盐性比空白菌株提高 50%; SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示有明显表达的蛋白质条带。

关键词:耐盐; 克隆; 大肠杆菌; 载体; 原核表达

中图分类号: Q785

文献标识码: A

Isolation of *HAL1* Gene and Its Expression in Prokaryotic Cell

YU Zhi-jing, WEI Zheng-yi, LUDONG Chang-cheng,

CAI Qin-an, HOU Jing-yao, XING Shao-chen*

(Biotechnology Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033, China)

Abstract: With yeast genomic DNA as the template, *HAL1* gene was amplified by PCR and ligated to the XhoI/EcoRI sites of pGEX-4T-1 vector, forming a new expression vector pGEX-*HAL1*. *E. coli* DH5 α competent cells were transformed with this recombinant plasmid. The *HAL1* protein was over expressed in *E. coli* by IPTG induction. The resistance to NaCl of recombinant plasmid increased 50% compared with that of the control *E. coli* strain. About 59 kD expected protein band was separated using SDS-PAGE analysis.

Key words: Salt tolerance; Clone; *E. coli*; Vector; Prokaryotic expression

由于气候环境条件的变化, 农作物受到的非生物因素的影响日益加重, 干旱、低温、盐碱、涝灾等因素成为制约农业生产的不利条件。据统计, 全球大约 20% 的耕地受到盐害威胁, 严重影响了植物的生长发育, 制约农业生产^[1]。随着生物技术的发展, 利用基因工程手段提高作物的耐盐水平是目前解决这个问题的重要途径, 已经从不同的植物当中克隆到受渗透胁迫诱导表达的基因 40 多个。迄今为止, 有研究证实, 渗透调节物质如甜菜碱、脯氨酸、山梨醇和甘露醇等在提高植物耐盐方

面具有渗透保护与调节作用, 但这些物质需要共同作用, 而单独对耐盐性的作用并不显著^[2]。耐盐基因 *HAL1* 最初来源于啤酒酵母的第 16 号染色体, 具有提高细胞中 K⁺ 的含量, 降低 Na⁺ 含量, 也就是提高 K⁺/Na⁺ 的比率^[3-4], 从而可以提高细胞耐盐性的作用。目前, *HAL1* 基因已经被转化到许多植物当中, 包括百脉根、烟草、拟南芥、番茄、燕麦、水稻和西瓜等不同植物中^[5-11], 而且都在一定程度上提高了转化材料的耐盐性。

本研究成功克隆了耐盐基因 *HAL1*, 并将它连接到 pGEX-4T-1 原核表达载体上, 构建了带 GST 标签的表达载体, 将重组质粒导入大肠杆菌表达宿主 DH5 α 中, 利用 IPTG 进行诱导表达, 并对寄主菌的耐盐性和表达蛋白进行了初步分析。本研究的实验结果为下一步利用该基因提高生物的耐盐水平提供了技术支持。

收稿日期: 2008-07-21

基金项目: 吉林省科技发展计划重大项目(20065008)资助

作者简介: 于志晶(1977-), 女, 硕士, 主要从事植物分子生物学和遗传转化工作。

通讯作者: 邢少辰, 男, 博士, 研究员, E-mail: xingsc64@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及质粒pGEX-4T-1 为本实验室保存。

1.1.2 酶与试剂

pGEM-T Easy 载体连接试剂盒、限制性内切酶等购自 Promega 公司 ;Agarose Gel DNA Extraction Kit 试剂盒购自 Roche 公司 ;其他化学试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基 : (1 L)
10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl , pH 值为 7.0。

1.2 方法

1.2.1 酵母 DNA 的提取

参照分子克隆实验指南[12]的方法分离与提取。

1.2.2 引物设计与合成

根据 GenBank 数据库中 *HAL1* 基因序列信息 (序列登记号 :EF015596) , 用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 扩增引物 , 上游引物为 5'-GC-CAAGCTTCATTTCAAAAGATTTAGGA-3' , 下游引物为 5'-GCCTCTAGACTCAACTATTCTGT-GTTGATTG-3'。

1.2.3 *HAL1* 基因的克隆

提取酵母 DNA ,以其为模板 ,用 Biometra 公司的 PCR 仪进行扩增。PCR 在 50 μ L 体系中进行 , 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s ,52 $^{\circ}$ C 退火 90 s ,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s ,共 35 个循环 ,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min ,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,用 Agarose Gel DNA Extraction Kit 试剂盒纯化回收 ,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

DNA 酶切、连接、转化和细菌感受态制备等基本基因操作技术参照 Sambrook 等的方法[13]及有关公司提供的操作手册进行。

将回收的目的基因连接到 T-vector 上 , 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 , 用质粒电泳和酶切方法来鉴定阳性克隆。在确认的阳性克隆中 ,随机挑选两个克隆送上海生工公司测序。将测序结果和所报道的序列用 Vector IVT18. 0 软件进行序列比对分析。提取阳性克隆质粒并命名为 T-*HAL1*。

1.2.4 表达载体 pGEX- *HAL1* 的构建

将 T-*HAL1* 质粒用 XhoI 和 EcoRI 双酶切 , 回收目的基因片段 , 与以相同酶切的表达载体 pGEX-4T-1 连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 ,用质粒电泳和酶切方法筛选鉴定阳性克隆 , 命名为 pGEX-*HAL1*。表达载体 pGEX-*HAL1* 的结构见图 1。

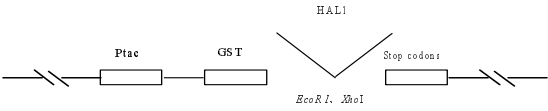


图 1 原核表达载体构建框架

1.2.5 目的基因在大肠杆菌中的耐盐性

将含有目的基因的菌种涂在分别含有 0、6%、8%、10%和 12%NaCl 的 LB 培养基上 ,24 h 后观察菌落生长情况。

1.2.6 耐盐基因 *HAL1* 的诱导表达及表达产物分析

挑取单个克隆的 pGEX-*HAL1* 于 10 mL 含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h ,然后按 2%接种量接种到新鲜 LB 培养液中 ,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时 , 加入 IPTG 至终浓度 1.0 mM ,诱导表达 3 h。取 12 mL 菌液 ,在 4 $^{\circ}$ C 条件下 ,8 000 r/min 离心 10 min , 弃上清液。沉淀用磷酸缓冲液 (100 mM ,pH 7.0)洗涤两次 , 洗涤后的沉淀重悬于裂解缓冲液 (100 mmol/L 的磷酸缓冲 1.0 mmol/L 的 PMSF)中 ,置冰浴中超声破碎。用浓缩胶为 5% ,分离胶 10%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳展示融合蛋白的表达情况。

2 结果与讨论

2.1 含有 *HAL1* 基因阳性克隆的鉴定与测序

PCR 产物在 0. 8%琼脂糖凝胶上电泳检测扩增片段 (图 2)。结果显示扩增片段大小约为 900 bp , 与预期一致。将上述 PCR 产物回收与 T-vector 连接 ,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。对得阳性克隆后提取质粒 ,用 XhoI 和 EcoRI 进行酶切鉴定 , 电泳后得到约 900bp 大小的片断 (图 3)。测序结果显示 ,目的序列和 Genbank 数据库的序列完全一致 ,证明已成功克隆了 *HAL1* 基因。

2.2 表达重载体的构建、筛选与鉴定

把 *HAL1* 基因连接到用 XhoI 和 EcoRI 双酶切的 pGEX-4T-1 载体上 , 经 PCR 和 XhoI 和 EcoRI 双酶切鉴定 , 表明外源片段已经正确连接

到表达质粒上。电泳结果见图 4 ,酶切鉴定的结果

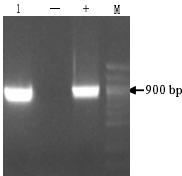


图 2 阳性克隆 PCR 鉴定
M. DNA 分子量标准 ; - . 水阴性对照 ;
+ . 质粒阳性对照 ;1. 阳性克隆

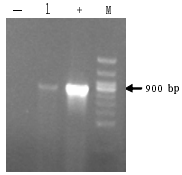


图 4 表达重组子 PCR 鉴定
M. DNA 分子量标准 ; - . 水阴性对照 ;
+ . 质粒阳性对照 ;1. 阳性克隆

2.3 大肠杆菌中转化重组载体后的耐盐性

表 1 目的基因在不同盐浓度的 LB 培养基中的生长情况

NaCl 浓度(%)	6	8	10	12
IPTG 诱导	+	+	+	-
不诱导	+	+	-	-
空载体对照	+	-	-	-

注 :+ 表示有菌落生长 ; - 表示没菌落生长。

将重组载体用热激法转化到大肠杆菌 DH5 α 当中 ,接种到 LB 平板培养基中 ,分析耐盐性表现。从表 1 可以看出 ,经过 IPTG 诱导的寄主菌可以在含有 10% NaCl 的 LB 培养基上正常生长 ,而未诱导的可以在含有 8% NaCl 的 LB 培养基上生长 ,对照空载体可以在含有 6%NaCl 的 LB 培养基上生长。当培养基中的 NaCl 浓度提高到 12%时 ,所有的处理均不能生长。说明 *HAL1* 经诱导表达后可以明显提高寄主菌的耐盐水平。

2.4 *HAL1* 的蛋白表达分析

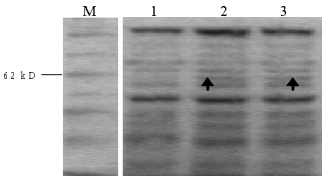


图 6 IPTG 诱导 *HAL1* 基因在大肠杆菌中的融合蛋白表达
M. 标准蛋白质 Maker ; 1. 不诱导 ;
2-3. IPTG 诱导(箭头示目标蛋白条带)

取诱导 3 h 后的菌液 ,离心破碎 ,用上清液进行 SDS-PAGE 电泳(图 6)。与未诱导的对照菌株相比 ,转化 pGEX-*HAL1* 的重组菌在分子量为 59 kD 的地方有明显的蛋白条带 ,与理论分子量的大小相一致 ,而没有诱导的菌液中没有发现相应的条带 ,因此我们可以推断 ,在大肠杆菌中 *HAL1* 基

见图 5。

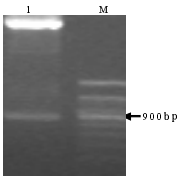


图 3 阳性克隆酶切鉴定
M. DNA 分子量标准 ; 1. 阳性克隆

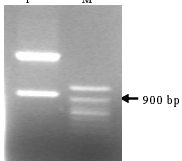


图 5 表达重组子酶切鉴定
M. DNA 分子量标准 ; 1. 阳性克隆

因可以被 IPTG 诱导并表达。

参考文献 :

[1] 曾华宗 ,罗利军 . 植物抗旱、耐盐基因研究概述[J] . 植物遗传资源学报 ,2003 ,4(3) :270-273 .
[2] 殷月兰 ,梁建生 ,刘巧泉 ,等 . 耐盐基因 *HAL1* 的克隆及植物表达载体的构建[J] . 扬州大学学报(农业与生命科学版) ,2002 ,23 (4) :27-29 .
[3] Gaxiola R, de Larrinoa, IF, Villalba JM, et al. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast [J] . EMBO, 1992, 11(9) 3157-3164
[4] Marquez JA, Serrano R. Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast [J] . FEBS letters, 1996, 382 89-92 .
[5] 韦正乙 ,刘艳芝 ,王兴智 ,等 . *HAL1* 基因转化百脉根(*Lotus cirniculatus*)的初步研究[J] . 吉林农业科学 ,2007 ,32(1) 14-16 .
[6] 李淑娟 ,杨传平 ,刘桂丰 ,等 . *HAL1* 基因转化烟草及其耐盐性[J] . 东北林业大学学报 ,2004 ,32(4) :47-49 .
[7] Yang SX, Zhao XY, Zhang Q, et al. *HAL1* mediates salt adaptation in *Arabidopsis thaliana* [J] . Cell Res, 2001, 11(2) 142-148.
[8] Gisbert C, Rus AM, Bolarin MC, et al. The yeast *HAL1* gene improve salt tolerance of transgenic tomato [J]. Plant Physiol., 2000, 123 : 393-402.
[9] 田吉林 ,杨玉爱 ,何玉科 . 转 *HAL1* 基因番茄的耐盐性 [J] . 植物生理与分子生物学学报 ,2003 ,29(5) :409 - 414 .
[10] Rohila JS, Jain GK, Wu R. Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley *HAL1* cDNA [J]. Plant Sci., 2002,163 (3) 525-532 .
[11] Ellul P, Rios G, Atares A, et al The expression of the *Saccharomyces cerevisiae HAL1* gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [Citrullus lanatus (Thunb) Matsun.& Nakai] [J] . Theor Appl Genet, 2003, 107 462-469 .
[12] J.萨姆布鲁克 ,等著 . 金冬雁 ,黎孟枫 ,等译 . 分子克隆实验指南(第二版) ,科学出版社 ,1986 .
[13] Sambrook J, et al. A laboratory manual (Third edition) [M]. New York :cold Spring Harbor library press, 2001 .